

REVISTA MÉDICA VALDECILLA

Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.

Martínez-Martínez L.

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria. Santander.

Palabras clave:

Resistencia,
Antimicrobianos,
 β -lactamasas,
Porinas, Diana,
Plásmidos,
Integrones,
Transposones,
Bacteriófagos.

Keywords:

Resistance,
Antimicrobial agents,
 β -lactamases,
Porins, Target,
Plasmids, Integrons,
Transposons,
Bacteriophages.

Resumen:

La resistencia a los antimicrobianos es en la actualidad un grave problema de salud. Estos compuestos seleccionan las bacterias resistentes que aparecen en las poblaciones bacterianas como consecuencia de errores en la replicación del ADN; algunos de ellos son capaces de inducir una respuesta bacteriana al estrés, ocasionando un incremento de la tasa de mutación que indirectamente puede favorecer el aumento de mutantes resistentes. A nivel bioquímico ello se traduce en distintos tipos de mecanismos: disminución de la acumulación intracelular (pérdida o alteración de porinas,...), hidrólisis o modificación (múltiples tipos de β -lactamasas, de enzimas modificadoras de aminoglucósidos,...), eliminación activa por bombas de expulsión, alteración, protección o hiperproducción de la diana (diversos ejemplos, como producción de la proteína fijadora de penicilina 2ª en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, genes en mosaico de *Streptococcus pneumoniae* resistente a β -lactámicos, alteraciones de topoisomerasas de clase II en cepas resistentes a quinolonas, modificación del lipopolisacárido en bacterias gramnegativas resistentes a polimixinas, proteínas Qnr, hiperproducción de dihidropteroatosintetasa que causa resistencia a sulfamidas) y aparición de nuevas vías metabólicas que suplen las que se bloquean por acción del antimicrobiano. Las bases genéticas del proceso son muy complejas y dependen de la aparición de mutaciones, de procesos de reorganización genética y de adquisición de genes por transferencia horizontal. Las secuencias de inserción, los diversos tipos de transposones y varias clases de integrones (en especial las clase 1, 2 y 3) son elementos genéticos relacionados con la resistencia. La adquisición de genes por transferencia horizontal puede tener lugar por medio de conjugación (asociada a ciertos tipos de plásmidos; el proceso más importante desde el punto de vista clínico), transducción (dependiente de bacteriófagos) o transformación (captura de ADN del medio externo). El conocimiento de todos estos mecanismos es importante para el control de la resistencia a los antimicrobianos.

Abstract:

Antimicrobial resistance is currently a major health problem. Antimicrobial agents select for resistant bacteria appearing as a consequence of mistakes occurring during DNA replication; some compounds are also able of inducing the SOS response, which determines an increased mutation rate and indirectly allow for the emergence of a higher number of resistant mutants. From a biochemical point of view this translates into different mechanisms, including: decreased intracellular accumulation (lost or altered porins,...), hydrolysis or modification (multiple β -lactamases, diverse aminoglycoside-modifying enzymes,...), active elimination by efflux pumps, alteration, protection or target hyperproduction (multiple examples, such as production of the penicillin-binding protein 2a in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, mosaic genes in β -lactam resistant *Streptococcus pneumoniae*, altered class II topoisomerases in quinolone-resistant bacteria, lipopolysaccharide modification in gramnegative organisms resistant to polymyxins, Qnr proteins, hyperproduction of dihydropteroate synthetase causing resistance to sulfamides) and creation of new metabolic pathways bypassing those blocked by antimicrobial agents. The genetic aspects of these mechanisms are very complex, being related to mutation, genetic reorganization and horizontal gene transfer. Insertion sequence, diverse types of transposons and several classes of integrons (particularly class 1, 2 and 3) are key elements related to resistance. Acquisition of resistance genes by horizontal transfer may occur by three different processes: conjugation (due to some plasmids; this is the most important process from a clinical point of view), transduction (related to bacteriophages) or transformation (capture of naked DNA from the environment). Improving our knowledge about these mechanisms is of great importance for the control of bacterial resistance to antimicrobial agents.

Correspondencia: lmartinez@humv.es

Introducción

La resistencia a los antimicrobianos representa en la actualidad uno de los principales problemas de salud, que afecta no solo al entorno del hospital sino también al resto del sistema sanitario¹.

El estudio de las bases bioquímicas y genéticas de este problema es uno de los aspectos claves para su adecuado control; dicha cuestión será el objeto de esta revisión. En la misma se abordará la resistencia en bacterias, pero realmente, también es preocupante la situación en hongos, virus y parásitos de interés clínico.

En los últimos años se está teniendo acceso a la información genética de miles de bacterias, gracias a las técnicas de secuenciación masiva². Esta tecnología ha permitido corroborar que la práctica totalidad de los microorganismos analizados presentan cierto grado de resistencia natural (intrínseca) a los antimicrobianos, bien por la presencia de genes que codifican mecanismos de resistencia, o bien porque carecen de la diana de acción donde deben actuar algunos antibióticos (Tabla 1). Además, los microorganismos pueden sufrir mutaciones o incorporar genes procedentes de otros microorganismos resistentes, sobreviniendo en este caso la denominada resistencia adquirida; esta última es aún más importante en clínica, por ser menos predecible que la resistencia intrínseca. Si, como consecuencia de la expresión de estos mecanismos, el microorganismo puede sobrevivir a las concentraciones que el antimicrobiano alcanza en el foco de la infección, la resistencia natural alcanza trascendencia clínica. Por tanto, desde este último punto de vista, el concepto de resistencia es relativo, implicando tanto al microorganismo, como al antimicrobiano como al paciente.

Una cuestión conceptual clave en el problema de la resistencia a los antimicrobianos es que las

poblaciones bacterianas pueden incluir individuos que, como consecuencia de errores no corregidos del proceso de replicación del ADN adecuadamente, contienen mutaciones capaces de otorgar una ventaja selectiva en presencia de antimicrobianos, precisamente porque dichas mutaciones se traducen en un mecanismo de resistencia. De este modo, los antimicrobianos eliminan a todos los individuos sin mutación (sensibles) y seleccionan los mutantes. Dicho de otro modo: las bacterias resistentes aparecen con independencia de que exista o no antimicrobiano en el entorno, pues este es solamente el elemento que lleva a cabo el proceso darwiniano de selección. También se ha demostrado que algunos antimicrobianos (fluoroquinolonas, trimetoprim,...) son capaces de inducir una respuesta bacteriana al estrés (respuesta tipo SOS, así denominada en referencia a la sencilla señal de socorro del código Morse ampliamente utilizada a nivel internacional) en la que se activan genes que codifican polimerasas de baja fidelidad (esto es, cometen más errores durante el proceso de replicación del ADN); como consecuencia de ello, las tasas de mutación se incrementan, y como algunas de estas mutaciones son beneficiosas para proteger a la bacteria del antimicrobiano que indujo SOS, en última instancia la presencia de ese antibiótico acaba generando más mutantes frente al mismo que cuando la bacteria crece en ausencia del mismo³; como puede entenderse, el antimicrobiano tiene una acción indirecta en este proceso, y tampoco podría considerarse que sea la causa primaria de la aparición de mutantes resistentes.

En los últimos años está adquiriendo especial importancia el concepto de multirresistencia a los antimicrobianos. Sorprendentemente, hasta no hace mucho no se había establecido una definición internacionalmente aceptada para este término⁴. En la actualidad se considera que un microorganismo presenta multirresistencia adquirida (*multidrug*

Tabla 1. Ejemplos de resistencia natural (intrínseca) a los antimicrobianos.

Microorganismo	Antimicrobiano	Mecanismo
Bacterias Grampositivas	Polimixinas	Diana (lipopolisacárido) ausente
<i>Enterococcus</i> spp.	Cefalosporinas	PBPs de baja afinidad
Bacterias Gramnegativas	Glucopéptidos	Baja acumulación intracelular
<i>Enterobacter</i> spp., <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , ...	Diversos β -lactámicos	$\beta\beta$ -lactamasa cromosómica de clase C
<i>Klbesiella</i> spp., <i>Cltrobacter koseri</i> ,...	Aminopenicilinas	β -lactamasa cromosómica de clase A
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Carbapenémicos	Carbapenemasa cromosómica de clase B
Anaerobios	Aminoglucósidos	Transporte inadecuado

Tabla 2. Mecanismos bioquímicos de resistencia a los antimicrobianos.

Tipo de mecanismo	Ejemplos
Disminución de la permeabilidad	Pérdida o modificación estructural de las porinas
Modificación del antimicrobiano	β -lactamasas; enzimas modificadoras de aminoglucósidos; Acetiltransferasa de cloranfenicol,...
Expulsión activa	Bombas de expulsión activa
Alteración, protección o hiperproducción de la diana	PBP2a de <i>S. aureus</i> resistente a meticilina PBPs en mosaico de <i>S. pneumoniae</i> Alteraciones de las topoisomerasas Alteración del peptidoglucano en <i>Enterococcus</i> resistentes a glucopéptidos Metilasas ribosómicas Proteínas Qnr Hiperproducción de dihidrofolato sintetasa
Nuevas vías metabólicas	Auxotrofismo de timina

resistant, en la nomenclatura inglesa, MDR) cuando al menos es resistente a un antimicrobiano de tres o más familias consideradas útiles en el tratamiento habitual del agente infeccioso en cuestión. Si solamente quedan representantes de dos familias de antimicrobianos como opciones terapéuticas, se dice que el microorganismo presenta multiresistencia extendida (*extensively drug-resistant*, XDR). Finalmente, si la bacteria es resistente a todos los antimicrobianos de todas las familias de antibióticos disponibles, se la considera panresistente (pandrug resistant, PDR)⁴.

Mecanismos bioquímicos de resistencia

Las bacterias disponen de múltiples mecanismos que desembocan en la incapacidad de los antimicrobianos para inhibir su crecimiento o causar su muerte. A continuación se presentan, de forma sucinta, estos mecanismos (Tabla 2).

1. Disminución de la acumulación intracelular de antimicrobiano.

Las bacterias gramnegativas presentan una membrana externa constituida por un bicapa atípica, pues su hoja interior está formada por fosfolípidos (como es habitual en otras membranas biológicas) pero su capa externa corresponde mayoritariamente a lipopolisacárido (LPS), lo que contribuye a una baja permeabilidad para compuestos hidrófilos, como son la mayoría de los antimicrobianos. Solo unos pocos antimicrobianos atraviesan de forma eficiente esta barrera lipopolisacárida. Por otra parte, las bacterias poseen canales proteicos (porinas) a través de los cuales diversos nutrientes alcanzan el interior del

microorganismo y (secundariamente para la bacteria) la mayoría de los antimicrobianos. En muchas enterobacterias, una pérdida o una modificación estructural de las porinas (por mutaciones, deleciones o inserciones en los correspondientes genes estructurales o en genes reguladores de los mismos), se traduce en una disminución de la permeabilidad que afecta a un amplio número de familias de antibióticos (β -lactámicos, quinolonas,...)⁵. En *P. aeruginosa*, la pérdida de la porina específica OprD (cuya función natural es facilitar la entrada de aminoácidos dibásicos y de otros compuestos), afecta de forma singular a los carbapenémicos (pero no a otros β -lactámicos ni a otras familias)⁶. Las causas genéticas de esta última circunstancia son similares a las que se han indicado para las enterobacterias.

Algunos trastornos de la cadena respiratoria dificultan el paso de los aminoglucósidos, un proceso dependiente de oxígeno. Por esa razón, estos compuestos son ineficaces a las dosis habituales (o como monoterapia) frente a anaerobios, *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp.

2. Hidrólisis o modificación del antimicrobiano.

La causa más importante de resistencia a los β -lactámicos es la hidrólisis por enzimas genéricamente denominadas β -lactamasas del anillo propio de estos compuestos⁷. Este mecanismo es fundamental en bacterias gramnegativas y también tiene importancia en bastantes bacterias grampositivas (en estas últimas, como se verá, hay también otros mecanismos de mayor trascendencia clínica). Se conocen cientos de variantes de

β -lactamasas, que pueden clasificarse en cuatro grandes clases (A, B, C y D) atendiendo a la secuencia de los genes que las codifican. Las enzimas de las clases A, C y D hidrolizan sus sustratos gracias a un residuo de serina en su sitio activo, mientras que las de clase D necesitan iones de cinc para llevar a cabo su función y por eso se denominan genéricamente metalo- β -lactamasas (MBL). Los genes que codifican las β -lactamasas pueden ser cromosómicos o plasmídicos. Por otra parte, el espectro hidrolítico de diversas variantes enzimáticas es muy variable, y abarca desde solamente las aminopenicilinas hasta los carbapenémicos.

Algunas enterobacterias, *P. aeruginosa* y otros no fermentadores producen una β -lactamasa de clase C (AmpC) codificada por un gen cromosómico⁸. AmpC es una cefalosporinasa, pero también afecta a las penicilinas; no se inhibe por ácido clavulánico ni por otros inhibidores similares, es muy poco activa frente a cefalosporinas de cuarta generación (cefepima) y frente a carbapenémicos, pero cuando en el mismo microorganismo la presencia del enzima se acompaña de pérdida de porinas, también puede presentarse resistencia a estos últimos compuestos. Su producción está estrictamente regulada en la mayoría de los casos⁹ (*Enterobacter* spp, *Citrobacter freundii*, y algunas otras enterobacterias, *P. aeruginosa*...), de tal forma que en ausencia de antimicrobiano la cantidad de enzima producida es (muy) baja, pero en presencia del mismo se produce una inducción del gen bla_{AmpC} y la cantidad aumenta considerablemente. En estas especies, además, pueden ocurrir mutaciones en los genes reguladores de la expresión de bla_{AmpC} que acusan una hiperproducción enzimática incluso en ausencia de β -lactámicos (cepas con producción desreprimida). En el caso particular de *E. coli*, la producción de AmpC no está sometida a este complejo sistema regulador que se ha comentado, pero también puede sobreexpresarse como consecuencia de mutaciones del promotor o del atenuador del gen estructural.

Las enterobacterias pueden producir también un enzima de clase C a partir de un gen localizado en un plásmido. En la mayoría de estos casos, las β -lactamasas de tipo AmpC plasmídicas no son inducibles, pero su producción basal es elevada y el nivel de resistencia que se observa en los correspondientes microorganismos es alto. En nuestro país se han llevado a cabo estudios que han permitido conocer que las AmpC plasmídicas más frecuentes son CMY-2 y DHA-1¹⁰.

Hay otras enzimas de codificación cromosómica intrínseca en diversos microorganismos como *Klebsiella* (un enzima que causa resistencia a amino y carboxipenicilinas) y en *Proteus vulgaris* (una

cefalosporinasa). En ambos casos la β -lactamasas corresponde a la clase A (las enzimas de este tipo, a diferencia de las clase C, sí se inhiben por ácido clavulánico).

En la actualidad los dos principales problemas de resistencia relacionados con las β -lactamasas son las β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) y con las carbapenemasas. Las BLEEs degradan penicilinas, cefalosporinas (salvo cefamicinas, como cefoxitina o cefotetan) y monobactámicos (aztreonam); en cambio no hidrolizan los carbapenémicos. Hay múltiples familias de BLEEs, pero las de mayor relevancia clínica por su frecuencia son las de tipo TEM, SHV o CTX-M; durante los últimos años en España y en otros muchos países la importancia de las BLEEs de la familia TEM ha disminuido en favor de las de la familia CTX-M (en particular CTX-M-15, CTX-M-14,...)^{11,12}. Los genes que codifican las BLEEs suelen estar localizados en plásmidos y probablemente se han originado a partir de genes cromosómicos de microorganismos ambientales, poco frecuentes en clínica, que se han movilizado a plásmidos conjugativos. Aunque inicialmente las cepas con BLEEs (en especial *K. pneumoniae*, en menor medida *E. coli*, *Enterobacter* spp.) eran más frecuentes en el entorno del hospital, desde hace ya años también son importantes en el medio extrahospitalario (sobre todo *E. coli* productor de CTX-M).

Las carbapenemasas, un variado grupo de enzimas así denominado por su capacidad de hidrolizar con más o menos eficacia los carbapenémicos, corresponden a las clases A (familias KPC, GES,...), B (grupo de las MBL, que incluyen las familias NDM, VIM, IMP,...) y D (enzimas intrínsecos o adquiridos de *Acinetobacter* spp. y enzimas adquiridas como las del grupo de OXA-48)¹³. Estas enzimas suponen un alarmante problema por cuanto hidrolizan los β -lactámicos de mayor espectro actualmente disponibles. Aunque algunas nuevas combinaciones de cefalosporinas de amplio espectro con un nuevo inhibidor (avibactam) son activas frente a carbapenemasas de clases A y D, las enzimas de clase B (MBL) siguen causando resistencia frente a estas combinaciones. En España, la carbapenemasa de mayor importancia clínica por su frecuencia es OXA-48, producida por diversos clones de *K. pneumoniae* (más infrecuentemente en otras enterobacterias), que están ampliamente distribuidos por todo el país¹⁴; también se han descrito casos y brotes de cepas con KPC, con VIM,... Por otra parte, las carbapenemasas son también muy importantes en *A. baumannii* resistente a carbapenémicos (OXA-23, OXA-24, OXA-51,...) y en *Pseudomonas* spp. (VIM-2,...)¹⁵, aunque en este último microorganismo la resistencia a carbapenémicos en muchos países

(incluida España) depende más de la pérdida de la porina OprD asociada a otros mecanismos de resistencia (producción de AmpC, sobreexpresión de bombas de expulsión activa) que de la presencia de carbapenemasas¹⁶.

No todas las carbapenemasas son enzimas eficientes desde el punto de vista hidrolítico (p. e j. OXA-48) y en ocasiones solamente producen ligeros incrementos de resistencia a los carbapenémicos. Además de las implicaciones clínicas derivadas de ello (no del todo bien conocidas por el momento), esta situación dificulta su detección en el laboratorio clínico, habiéndose diseñado diferentes métodos para resolver esta cuestión, tanto fenotípicos moleculares.

La resistencia a los aminoglucósidos¹⁷ está determinada por múltiples mecanismos, de los que la producción de enzimas modificadores es de gran importancia¹⁸. Se distinguen tres familias de enzimas, dependiendo del tipo de modificación que estas llevan a cabo: N-acetilación, O-nucleotidilación y O-fosforilización. En cada familia hay un amplio número de proteínas codificadas por diferentes genes, que pueden ser tanto cromosómicos como plasmídicos y que con cierta frecuencia forman parte de integrones y transposones. No es fácil inferir qué enzima concreto puede tener un determinado microorganismo, pues el mismo aminoglucósido puede ser modificado por enzimas distintos y una bacteria dada puede expresar más de un enzima, o incluso expresar mecanismos de resistencia adicionales para este grupo de compuestos. En estas circunstancias, por el momento, la caracterización del enzima o los enzimas implicados en un cierto fenotipo de resistencia se debe llevar a cabo empleando métodos moleculares.

Una variante de una acetiltransferasa de aminoglucósidos [Aac(6')-Ib-cr] tiene la capacidad de modificar también algunas quinolonas como ciprofloxacino. Este enzima está codificado por

un gen que con frecuencia (pero no siempre) se encuentra en plásmidos, y supone uno de los mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas más frecuentes.

La acetil-transferasa de cloranfenicol y las enzimas inactivantes de macrólidos, lincosamidas y estreptograminas son ejemplos adicionales de resistencia por modificación enzimática de los sustratos.

3. Eliminación activa.

Las bacterias poseen proteínas en la membrana citoplásmica que utilizando energía procedente de la hidrólisis del ATP o de la fuerza motriz de protones son capaces de expulsar nuevamente al medio externo las moléculas de antibióticos que hubieran penetrado previamente¹⁹. En la actualidad se conocen seis grandes familias de bombas de expulsión activa: ABC (*"ATP-binding cassette"*), MFS (*"major facilitator superfamily"*), SMR (*"small multidrug resistance"*), RND (*"resistance-nodulation-division"*), MATE (*"multidrug and toxin extrusion"*) y PACE: (*"Proteobacterial antimicrobial compound efflux"*); de esta última familia se conoce una bomba que elimina clorhexidina, pero (que se sepa por el momento) no expulsa antibióticos (Tabla 3). Algunas de estas familias incluyen decenas de proteínas diferentes.

Desde el punto de vista funcional, algunas bombas tienen un reducido espectro de sustrato (p. ej. bombas tipo TET que eliminan tetraciclinas) mientras que otras denominadas bombas de expulsión multidroga poseen la capacidad de eliminar muchos tipos de compuestos.

Las bombas de la familia RND de bacterias gramnegativas²⁰ están asociadas funcionalmente a otras dos proteínas, una de las cuales forma un canal en la membrana externa por donde se elimina el antimicrobiano y otra que conecta la bomba y el canal (proteína de fusión de membrana, PFM). En muchos

Tabla 3. Familias de bombas de expulsión activa de antimicrobianos de uso clínico.

Familia	Fuente de energía	Ejemplos	Sustratos
MFS	Fuerza motriz de protones	Bombas TET, QacA, NorA	CLP, FQ
SMR	Fuerza motriz de protones	Smr, EmrE	CLP, TET
RND	Fuerza motriz de protones	AcrAB-TolC MexAB-OprM y otras	TET, ERI, BL, FQ,... TET, ERI, BL, FQ, CLO, AMG...
MATE	Fuerza motriz de protones	YdhE	FQ, AMG
ABC	Hidrólisis del ATP	McbF	FQ

^aAMG: Aminoglucósidos; CLO: cloranfenicol, CLP: Cationes lipofílicos, ERI: Eritromicina, BL: β -lactámicos, FQ: Fluoroquinolonas, TET: tetraciclinas.

casos los genes que codifican las tres proteínas de este tipo de sistemas forman parte de un mismo operón (p. ej. en varias de las bombas RND de *P. aeruginosa*), aunque en el caso de la principal bomba de expulsión de *E. coli* y otras enterobacterias, la bomba (AcrB) y la PFM (AcrA) se codifican por un operón y el canal de membrana (TolC) por un gen localizado en otra región del cromosoma²¹.

Como en el caso de la resistencia debido a alteraciones de las porinas, las bombas de expulsión causan habitualmente un bajo nivel de resistencia, pero estos sistemas (que pueden expresarse de forma intrínseca) pueden asociarse a la expresión de otros mecanismos de resistencia y contribuir así a la resistencia clínicamente relevante.

4. Alteración, protección o hiperproducción de la diana.

En las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM), el principal mecanismo de resistencia a β -lactámicos es la producción de la proteína fijadora de penicilina 2a (PBP2a, de las siglas en inglés *penicillin-binding protein*), que está codificada por el gen *mecA*²². Este gen es parte de un elemento denominado SCC ("*staphylococcal chromosomal cassette*"), del que se conocen múltiples variantes moleculares. La PBP2a no existe en las cepas sensibles, y a diferencia de las PBPs habituales de esta especie, no se inhibe por la gran mayoría de β -lactámicos disponibles, con excepción de algunas nuevas cefalosporinas como ceftarolina o ceftobiprole. Recientemente, se han descrito cepas con un gen relacionado, pero diferente de *mecA*, conocido como *mecC*²³, responsable igualmente de resistencia a meticilina.

La práctica totalidad de las cepas de SARM son multirresistentes, porque además de la resistencia a la práctica totalidad de β -lactámicos disponibles, frecuentemente contienen genes de resistencia para otras familias de antimicrobianos (quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas,... etc).

Algunas cepas de SARM lo son por mutaciones en los genes que codifican las PBPs habituales de *S. aureus*. Se ha descrito²⁴, por ejemplo, resistencia a cefalosporinas (incluyendo ceftarolina) por alteraciones en la PBP4.

En *Streptococcus* (con particular importancia en *S. pneumoniae*), la resistencia a β -lactámicos se debe a la existencia de genes en mosaico, adquiridos por transformación natural, que codifican PBPs con baja afinidad por sus inhibidores²⁵. Estas PBPs híbridas contienen algunos fragmentos de la PBP original de la cepa sensible y otros procedentes de cepas originalmente resistentes a β -lactámicos.

Las modificaciones ribosómicas causadas por metilasas en la subunidad 50S del 23SARN que afectan a sitio de unión de algunos antimicrobianos son una causa importante de resistencia (simultánea) en grampositivos a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas de clase B (fenotipo MLS_B)²⁶. Las alteraciones del ARN ribosómico también causan resistencia a las oxazolidinonas o a las tetraciclinas, y las mutaciones que afectan a los genes que codifican las proteínas ribosómicas son otras causas de resistencia a aminoglucósidos o a macrólidos.

En *Enterococcus*, la resistencia a glucopéptidos es consecuencia de alteraciones de la diana de estos antimicrobianos. Las cepas sensibles a vancomina y teicoplanina contienen D-alanina-D-alanina en el peptidoglucano, mientras que en las cepas resistentes este polímero contiene D-alanina-D-lactato o D-alanina-D-serina, con una afinidad disminuida por los glucopéptidos²⁷. Se han descrito múltiples variantes de este mecanismo, de las cuales las del tipo A (relacionadas con el gen *vanA*) o B (gen *vanB*) son las de mayor relevancia desde por su frecuencia en aislamientos clínicos. Las bases genéticas del proceso son muy complejas, pues hacen falta múltiples genes que no solamente codifiquen las modificaciones antes indicadas, sino que también impidan la incorporación de los componentes naturales del peptidoglucano. Por el momento, la importancia de este problema es menor en España que en otros países europeos o en EE.UU. También se han descrito unas pocas cepas de *S. aureus* que expresan el gen *vanA*²⁸.

Se conocen múltiples mecanismos de resistencia a quinolonas, algunos mediados por genes cromosómicos y otros por genes plasmídicos. De entre los mecanismos cromosómicos, el más importante corresponde a las alteraciones en las dianas de estos antimicrobianos (las topoisomerasas de clase II: la ADN-girasa o topoisomerasa II y la topoisomerasa IV) como consecuencia de mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* que codifican las subunidades A de las citadas enzimas (con menor importancia clínica, las mutaciones en *gyrB* y *parE*, que codifican las subunidades B)²⁹. Estas mutaciones se acumulan de forma preferente en ciertas posiciones de una pequeña región de los citados genes denominada QRDR (del inglés: *quinolone-resistance determining region*). En bacterias gramnegativas, inicialmente, una sola mutación en *gyrA* causa un bajo nivel de resistencia a fluoroquinolonas, que no siempre sobrepasa el punto de corte aceptado como indicador de resistencia clínica, pero el acúmulo de mutaciones en *gyrA/parC* se traduce en incrementos crecientes del nivel de resistencia. En bacterias grampositivas ocurre algo análogo, aunque en este caso las primeras mutaciones suelen ocurrir en

parC, y con posterioridad en *gyrA*. Las mutaciones en las regiones QRDR suelen coincidir con otras que afectan a porinas o a bombas de expulsión activa, con las que interactúan para incrementar aún más el nivel de resistencia³⁰.

La resistencia a quinolonas también puede deberse a un mecanismo de protección (en vez de modificación) de la diana, llevado a cabo proteínas de la familia Qnr. Este mecanismo se descubrió inicialmente en relación con genes codificados por plásmidos³¹, pero también se conocen proteínas codificadas por genes cromosómicos. Se conocen varias familias de genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *QnrS*,...) que son más frecuentes en enterobacterias. De nuevo en este caso, la resistencia determinada por Qnr es de bajo nivel y se relaciona con fenotipos infrecuentes en los que (a diferencia de lo que sucede por mutaciones que afectan a las topoisomerasas) hay solo un moderado impacto en la actividad del ácido nalidíxico.

La resistencia a polimixinas depende de la modificación del lípido A (uno de los componentes del LPS), lo que ocasiona una disminución de su afinidad por estos compuestos³². Habitualmente, la resistencia se debe a mutaciones en sistemas de doble componente (PmrAB, PhoPQ) o en un regulador negativo codificado por *mgrB*, que regulan la capacidad del microorganismo para añadir al lípido A restos de fosfoetanolamina o 4-amino-4-arabinosa. Con menos frecuencia, se produce la pérdida del LPS por mutaciones en los genes estructurales de la vía metabólica de este compuesto. Recientemente, se ha descrito un gen plasmídico (*mrc-1*) que codifica también una fosfoetanolamino transferasa³³.

Las mutaciones en gen *rpoB*, que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa son responsables de la resistencia a rifampicina. La hiperproducción de dihidropteroatosintetasa o dihidrofolatoreductasa, por su parte, se traduce en resistencia a las sulfamidas y al trimetoprim, respectivamente.

5. Nuevas vías metabólicas.

Probablemente desde el punto de vista clínico esta posibilidad es la menos relevante. El mejor ejemplo conocido es el de los mutantes auxotrofos dependientes de timina que son resistentes a sulfamidas, al poder incorporar directamente del medio los sustratos cuya síntesis depende enzimas inhibidas por estos antimicrobianos.

Bases genéticas de la adquisición de resistencias

Las bacterias se hacen resistentes a los antimicrobianos por distintos procesos genéticos: aparición de mutaciones en genes cromosómicos o plasmídicos, reorganización genética y adquisición

de genes de resistencia mediante procesos de transferencia horizontal.

Una vez que un microorganismo ha adquirido un gen de resistencia, este puede mutar como ocurre con los genes del genoma bacteriano original.

Las mutaciones bacterianas son consecuencia de los errores no corregidos del proceso de replicación del ADN. Se estima que para cada gen y por término medio se produce una mutación en cada 10⁸ microorganismos de una población bacteriana. En presencia del antimicrobiano las mutantes sobrevivirán y, como siguen creciendo en presencia del antibiótico al que son resistentes, con el tiempo acabará reemplazando a la población original.

En la Tabla 4 se recogen algunos ejemplos de resistencia a los antimicrobianos causada por mutaciones en genes de bacterias inicialmente sensibles.

La reorganización genética se relaciona con secuencias de inserción, transposones e integrones. Las secuencias de inserción (*insertion sequences*, IS) son elementos genéticos de pequeño tamaño (no suelen tener más de 2500 pares de bases) con un gen que codifica una proteína responsable de un proceso de transposición del propio elemento y otro que codifica un elemento regulador de la transposición³⁴. La IS suele poseer en sus extremos secuencias repetidas inversas. Las IS pueden interrumpir genes que cuando se pierden (ej., los que codifican porinas) causan resistencia, o bien proporcionan nuevos promotores a genes que, al aumentar su expresión, elevan el nivel de resistencia.

Los transposones carecen de la posibilidad de replicación autónoma, pero gracias a un proceso de transposición mediado por una transposasa se movilizan entre los elementos del genoma bacteriano³⁵⁻³⁷. Hay transposones (compuestos) que estructuralmente se corresponden con dos ISs que flanquean uno o varios genes accesorios (p. ej., de resistencia a los antimicrobianos); en otros casos el transposón carece de IS flanqueantes. Algunos transposones son conjugativos, pudiendo transferirse entre genomas de dos bacterias distintas, siendo de especial interés en algunas bacterias grampositivas como *Enterococcus* y *Streptococcus*. Por otro lado, los transposones no conjugativos pueden integrarse en plásmidos movilizables e, indirectamente, diseminarse entre microorganismos. Algunos transposones se movilizan directamente a una nueva localización genómica, por lo que no aumentan el número total de copias del mismo en la bacteria, pero otros sufren un proceso de transposición no conservadora que en ocasiones acaba generando una nueva copia del transposón en el sitio diana, y al

Tabla 4. Ejemplos de resistencia codificada por mutaciones cromosómicas.

Antimicrobiano	Gen	Mecanismo
Rifampicina	<i>rpoB</i>	Modificación de la subunidad β de la ARN polimerasa
Quinolonas	<i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> , <i>parE</i>	Modificación de las topoisomerasas de clase II
Aminoglucósidos	<i>rpsL</i>	Modificaciones de las proteínas ribosómicas
Quinolonas, cloranfenicol, tetraciclinas, etc.	<i>acrR</i>	Mutación en el regulador AcrB que determina la sobreproducción de la bomba de expulsión AcrAB
β -lactámicos	<i>ampD</i>	Hiperproducción de la β -lactamasa AmpC
Carbapenémicos	<i>oprD</i>	Ausencia de la porina de <i>P. aeruginosa</i> para la entrada de carbapenémicos
Oxazolidinonas	<i>rrn</i>	Modificación del 23S rARN

mismo tiempo permite conservar una copia en el sitio inicial donde se encontraba el elemento genético.

Los integrones³⁸ son estructuras genéticas de captura y expresión de genes exógenos, que aseguran su movilidad cuando están inmersos en transposones o plásmidos. Poseen un gen (*intI*) que codifica una integrasa, la cual permite la recombinación entre un casete genético (un elemento exógeno correspondiente a un marco de lectura abierta más un elemento conocido como *attC*) y un sitio de recombinación denominado *attI*; el marco de lectura abierta así integrado se expresa como un gen a partir de un promotor del integrón. Todos estos componentes forman parte de una región constante localizada en el extremo 5'. Muchos de los casetes génicos de los integrones se corresponden con genes de resistencia (para una infinidad de antimicrobianos distintos). Dependiendo de la secuencia de *intI*, se conocen varias clases de integrones, de los que

las clases 1, 2 y 3 son las más frecuentes y las de mayor interés en relación con la resistencia a los antimicrobianos. Los integrones de clase 1 poseen una segunda región constante en el extremo 3', que contiene un fragmento del gen *qacE1* (resistencia a compuestos de amonios cuaternarios) y el gen *sul1* (responsable de resistencia a sulfamidas); entre ambas regiones constantes se encuentra una región variable con uno o más genes (casetes génicos) de resistencia, cuya expresión es mayor cuanto más cerca estén del promotor del integrón.

La transferencia genética horizontal por la que las bacterias adquieren genes de resistencia exógenos puede ocurrir por tres vías: conjugación, transformación o transducción, de las que la más importante, tanto por su frecuencia como por las consecuencias clínicas que ocasiona, es la primera³⁹.

La conjugación ocurre por el paso de cierto tipo de plásmidos presentes en bacterias donantes

Tabla 5. Ejemplos de resistencia codificada por genes plasmídicos.

Antimicrobiano	Proteína	Mecanismo	Especies
β -lactámicos	β -lactamasas	Hidrólisis del anillo β -lactámico	Múltiples
Aminoglucósidos	Enzimas modificadoras de aminoglucósidos	Acetilación, fosforilación, adenilación	Múltiples
	Metilasas	Metilación del rARN	Gramnegativos
Quinolonas	Proteínas Qnr	Protección de las topoisomerasas de clase II	Enterobacterias y otros gramnegativos
Glucopéptidos	Varias	Modificación del peptidoglucano	<i>Enterococcus</i> spp., otros grampositivos
Macrólidos	Metilasas	Metilación del rARN	Grampositivos
Tetraciclinas	Expulsión activa		Múltiples

a otras bacterias (receptoras) que carecían del mismo. Los plásmidos⁴⁰ son fragmentos de ADN extracromosómico con replicación propia, habitualmente circulares y con un tamaño muy variable (desde unos pocos miles de pares de bases hasta los 400 kb). Una misma bacteria puede tener varios tipos de plásmidos y de cada uno de ellos puede haber una o múltiples copias. No son capaces de replicarse porque necesitan la maquinaria del cromosoma bacteriano. Los denominados plásmidos conjugativos (que pueden contener genes de resistencia) codifican proteínas que aseguran su paso de una bacteria a otra. En algunos casos, ciertos plásmidos que no son estrictamente conjugativos también se pueden movilizar entre bacterias si son capaces de aprovechar la maquinaria de otro plásmido conjugativo que coexista en la misma bacteria donante. Los genes de resistencia codificados por plásmidos (que a su vez pueden estar formando parte de integrones o transposones) pueden luego integrarse en otros plásmidos o incluso en el cromosoma de la bacteria. Hay una amplísima variedad de plásmidos, pudiendo hacerse una clasificación en función de la incompatibilidad (un plásmido de un determinado grupo no puede, en principio, coexistir con otro plásmido de ese mismo grupo en la misma bacteria) o de la secuencia de la proteína relaxasa, implicada en el paso del ADN plasmídico desde la bacteria donante a la receptora^{41,42}. En la Tabla 5 se recogen algunos ejemplos de mecanismos de resistencia codificados por plásmidos.

El proceso de transformación permite a algunas bacterias incorporar de forma natural moléculas de ADN del entorno, que luego son integradas en su genoma mediante recombinación. La transformación es responsable de nuevas propiedades en la bacteria (un ejemplo clásico es el de la modificación del tipo capsular en *S. pneumoniae*). La resistencia a penicilina *S. pneumoniae* sobreviene por la recombinación entre genes que codifican PBPs de una determinada bacteria y genes de igual función que proceden de otros clones de esta misma especie o incluso de otras especies de *Streptococcus*. Los genes en mosaico que se originan así codifican PBPs que tienen menor afinidad por los β -lactámicos que las proteínas originales⁴³.

Finalmente, la transducción es un proceso que depende de bacteriófagos. Estos virus bacterianos en ocasiones incorporan a su genoma porciones de ADN (en el caso que nos importa, genes de resistencia) presentes en una bacteria que hayan invadido con anterioridad; de esta forma, cuando parasitan a otro huésped son capaces de transferir el ADN bacteriano a la nueva bacteria. Se sabe que mediante este proceso se pueden adquirir, entre

otros, genes que codifican β -lactamasas (penicilinasas de *S. aureus*, β -lactamasas de espectro extendido, carbapenemasas) o proteínas Qnr⁴⁴.

Bibliografía

1. Nathan C, Cars O. Antibiotic resistance--problems, progress, and prospects. *N Engl J Med*. 2014;371:1761-1763.
2. Punina NV, Makridakis NM, Remnev MA, et al. Whole-genome sequencing targets drug-resistant bacterial infections. *Human Genomics*. 2015;9:19.
3. Baharoglu Z, Mazel D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev*. 2014;38:1126-1145.
4. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:268-281.
5. Martínez-Martínez L. Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14 Suppl 1:82-89.
6. Ocampo-Sosa AA, Cabot G, Rodríguez C, et al; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:1703-1713.
7. Bush K. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *J Infect Chemother*. 2013;19:549-559.
8. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22:161-182.
9. Hanson ND, Sanders CC. Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among Enterobacteriaceae. *Curr Pharm Des*. 1999;5:881-894.
10. Miró E, Agüero J, Larrosa MN, et al. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC β -lactamases and carbapenemases in Enterobacteriaceae isolates from 35 hospitals in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32:253-259.
11. Díaz MA, Hernández-Bello JR, Rodríguez-Baño J, et al; Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: second nationwide study. *J Clin Microbiol*. 2010;48:2840-2845.
12. Ruiz de Alegría C, Rodríguez-Baño J, Cano ME, et al; Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: microbiological and clinical features. *J Clin Microbiol*. 2011;49:1134-1136.
13. Martínez-Martínez L, González-López JJ. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: types and molecular epidemiology. *Enferm Infect Microbiol Clin*. 2014;32 Suppl 4:4-9.
14. Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, et al; GEIH-GEMARA (SEIMC) and REIPI. Prospective multicenter study of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:3406-3412.
15. Ocampo-Sosa AA, Guzmán-Gómez LP, Fernández-Martínez M, et al. Isolation of VIM-2-producing *Pseudomonas monteilii* clinical strains disseminated in a tertiary hospital in northern Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:1334-1336.
16. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Tubau F, et al; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:1906-1911.
17. Becker B, Cooper MA. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. *ACS Chem Biol*. 2013;8:105-115.

18. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*. 2010;13:151-171.
19. Delmar JA, Su CC, Yu EW. Bacterial multidrug efflux transporters. *Annu Rev Biophys*. 2014;43:93-117.
20. Alvarez-Ortega C, Olivares J, Martínez JL. RND multidrug efflux pumps: what are they good for? *Front Microbiol*. 2013;4:7.
21. Nikaido H, Zgurskaya HI. AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2001;3:215-218.
22. Peacock SJ, Paterson GK. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem*. 2015;84:577-601.
23. Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*. 2014;22:42-47.
24. Greninger AL, Chatterjee SS, Chan LC, Hamilton SM, Chambers HF, Chiu CY. Whole-genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to fifth-generation cephalosporins reveals Potential non-mecA mechanisms of resistance. *PLoS One*. 2016, 11:e0149541.
25. Brückner R, Nuhn M, Reichmann P, et al. Mosaic genes and mosaic chromosomes-genomic variation in *Streptococcus pneumoniae*. *Int J Med Microbiol*. 2004;294:157-168.
26. Roberts MC. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol Lett*. 2008;282:147-159.
27. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis*. 2006;42 Suppl 1:S25-34.
28. Périchon B, Courvalin P. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:4580-4587.
29. Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1354:12-31.
30. Martínez-Martínez L, Pascual A, Conejo Mdel C, et al. Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum beta-lactamase production. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:3926-3932.
31. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*. 1998;351:797-799.
32. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*. 2014;5:643.
33. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16:161-168.
34. Siguier P, Gournayre E, Chandler M. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol Rev*;38:865-891.
35. Roberts AP, Mullany P. Tn916-like genetic elements: a diverse group of modular mobile elements conferring antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2011;35:856-871.
36. Nicolas E, Lambin M, Dandoy D, et al. The Tn3-family of Replicative Transposons. *Microbiol Spectr*. 2015;3: MDNA3-0060-2014.
37. Haniford DB, Ellis MJ. Transposons Tn10 and Tn5. *Microbiol Spectr*. 2015;3(1):MDNA3-0002-2014.
38. Gillings MR. Integrins: past, present, and future. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014;78:257-277.
39. von Wintersdorff CJ, Penders J, van Niekerk JM, et al. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol*. 2016;7:173.
40. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28:565-591.
41. Carattoli A, Bertini A, Villa L, et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*. 2005;63:219-228.
42. Alvarado A, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F. A degenerate primer MOB typing (DPMT) method to classify gamma-proteobacterial plasmids in clinical and environmental settings. *PLoS One*. 2012;7:e40438.
43. Sibold C, Henrichsen J, König A, et al. Mosaic pbpX genes of major clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* have evolved from pbpX genes of a penicillin-sensitive *Streptococcus oralis*. *Mol Microbiol*. 1994;12:1013-1023.
44. Brown-Jaque M, Calero-Cáceres W, Muniesa M. Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid*. 2015;79:1-7.